

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年1 月31 日 (31.01.2002)

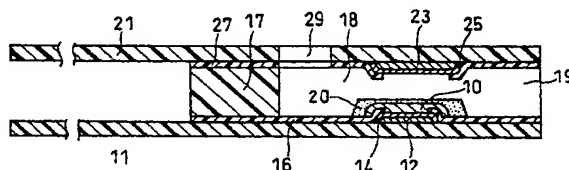
PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/08743 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/447 屋町3-1-10 Osaka (JP). 池田 信 (IKEDA, Shin) [JP/JP]; 〒576-0022 大阪府交野市藤が尾2-5-16-205 Osaka (JP).
(21) 国際出願番号: PCT/JP01/06188 南海史朗 (NANKAI, Shiro) [JP/JP]; 〒573-0071 大阪府枚方市茄子作4-50-12 Osaka (JP).
(22) 国際出願日: 2001 年7 月17 日 (17.07.2001)
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 石井和郎 (ISHII, Kazuo); 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜2丁目3番6号 北浜山本ビル Osaka (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CN, JP, US.
(30) 優先権データ: (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
特願2000-222266 2000 年7 月24 日 (24.07.2000) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka (JP).
添付公開書類:
— 国際調査報告書
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷池優子 (TANI-IKE, Yuko) [JP/JP]; 〒542-0066 大阪府大阪市中央区瓦
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: BIOSENSOR

(54) 発明の名称: バイオセンサ



(57) Abstract: The invention provides a high-sensitivity biosensor that needs fewer samples for measurement. The biosensor comprises a first insulating substrate with a working electrode, a second insulating substrate with a counter electrode opposed to the working electrode, a reagent layer including at least redox enzyme, and a sample feeder formed between the first and second insulating substrates. The working electrode, the counter electrode and the reagent layer are exposed in the sample feeder, and the working electrode and the counter electrode are spaced at an interval of less than 150 microns.

[続葉有]

WO 02/08743 A1



(57) 要約:

本発明は、測定に必要なサンプル量が少なく、かつ高感度のバイオセンサを提供する。このバイオセンサは、作用極を有する第1の絶縁性基板、前記作用極と対向させた対極を有する第2の絶縁性基板、少なくとも酸化還元酵素を含む試薬層、並びに第1および第2の絶縁性基板の間に形成された試料供給路を具備し、前記試料供給路内に前記作用極、対極および試薬層が露出し、かつ前記作用極と前記対極との距離が150 μm 以下である。

明 細 書

バイオセンサ

技術分野

本発明は、試料中に含まれる基質を迅速、かつ高精度に定量するためのバイオセンサに関する。

背景技術

スクロース、グルコースなど糖類の定量分析法として、施光度計法、比色法、還元滴定法および各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法は、いずれも糖類に対する特異性があまり高くないので、精度が悪い。これらの方法のうち施光度計法によれば、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、施光度計法は、一般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。

近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。

以下に、試料中の基質の定量法の一例として、グルコースの定量法について説明する。

電気化学的なグルコースの定量法としては、酵素であるグルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4：以下GODと略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用する方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサー」講談社）。

GODは、酸素を電子伝達体として、基質である β -D-グルコースをD-グルコノ- δ -ラクトンに選択的に酸化する。酸素の存在下で、

GODによる酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計測する。酸素の減少量および過酸化水素の増加量は、試料中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースを定量することができる。

上記方法では、酵素反応の特異性を利用することにより、精度良く試料中のグルコースを定量することができる。しかし、反応過程からも推測できるように、測定結果は試料に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点があり、試料に酸素が存在しない場合は測定が不可能となる。

そこで、酸素を電子伝達体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子伝達体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子伝達体の還元体を作用極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料中に含まれるグルコース濃度が求められる。この際、対極上では、電子伝達体の酸化体が還元され、電子伝達体の還元体の生成する反応が進行する。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子伝達体として用いることにより、既知量のGODとそれらの電子伝達体を安定な状態で正確に電極上に担持させて試薬層を形成することが可能となり、試料中の酸素濃度の影響を受けることなく、精度良くグルコースを定量することができる。また、酵素および電子伝達体を含有する試薬層を、乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサが近年多くの注目を集めている。その代表的な例が、特許第2517153号公報に示されるバイオセンサである。使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続さ

れたセンサに、試料を導入するだけで、容易にグルコース濃度を測定器で測定することができる。

上記の様なグルコースセンサを用いた測定では、数 μ lオーダーの試料量で試料中の基質濃度を容易に求めることが可能である。しかしながら、近年、1 μ l以下程度とさらに微量な試料での測定が可能なバイオセンサの開発が各方面において切望されている。従来の電気化学グルコースセンサでは、殆どの場合、一平面上に電極系が配置されている。そのため、試料が極微量の場合は、電極間の電荷移動、主にイオンの移動に対する抵抗が大きくなることにより、測定結果にバラツキが生じる場合があった。

そこで、作用極と対極が相互に対向する位置に配置されたバイオセンサが提案されている（特開平11-352093号公報）。このタイプのセンサでは、作用極と対極が相互に対向する位置に配置されたことにより、作用極－対極間のイオン移動が円滑になる等の理由により、従来の一平面上に電極系が配置されたバイオセンサよりも、高精度、かつ高感度で、試料中に含まれるグルコース等の基質を定量することができる。

近年、測定に必要なサンプル量のさらなる微量化が求められていることから、さらに微量のサンプルにおいても測定可能となるように、バイオセンサのさらなる高感度化が切望されている。

本発明は、上記課題に鑑み、測定に必要なサンプル量が少なく、かつ高感度のバイオセンサを提供することを目的とする。

発明の開示

本発明のバイオセンサは、作用極を有する第1の絶縁性基板、前記作用極と対向させた対極を有する第2の絶縁性基板、少なくとも酸化還元酵素を含む試薬層、並びに第1および第2の絶縁性基板の間に形成され

た試料供給路を具備し、前記試料供給路内に前記作用極、対極および試薬層が露出し、かつ前記作用極と前記対極との距離が $150\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とする。

ここで、対極の試料供給路に露出している部分の面積は、作用極の試料供給路に露出している部分の面積と同じかそれ以下であり、かつ前記作用極の直上に前記対極が位置することが好ましい。

作用極は、試料供給路に露出している部分の面積 S_1 が $0.01\sim 2.0\text{mm}^2$ 、より好ましくは $0.1\sim 2.0\text{mm}^2$ 、対極の試料供給路に露出している部分の面積 S_2 が $0.005\sim 2.0\text{mm}^2$ 、より好ましくは $0.05\sim 2.0\text{mm}^2$ であり、 $S_2\leq S_1$ であることが好ましい。

ここで、第1および第2の基板の間にスペーサ部材を挟んだ構成が好ましい。

図面の簡単な説明

図1は本発明の一実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた分解斜視図である。

図2は同グルコースセンサの縦断面図である。

図3は本発明の他の実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた分解斜視図である。

図4は本発明のさらに他の実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた分解斜視図である。

図5は同グルコースセンサの縦断面図である。

図6は本発明のさらに他の実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた分解斜視図である。

図7は同グルコースセンサの縦断面図である。

図8は比較例のグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除い

た分解斜視図である。

図 9 は同グルコースセンサの縦断面図である。

図 10 は本発明の実施例 1 のグルコースセンサの試料供給路高さと応答電流値（比）との関係を示すグラフである。

図 11 は本発明の実施例 2 のグルコースセンサの作用極－対極間距離と応答電流値（比）との関係を示すグラフである。

図 12 は本発明の実施例 3 のグルコースセンサの作用極－対極間距離と応答電流値（比）との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明のバイオセンサは、作用極を有する第 1 の絶縁性基板、前記作用極と対向させた対極を有する第 2 の絶縁性基板、少なくとも酸化還元酵素を含む試薬層、並びに第 1 および第 2 の絶縁性基板の間に形成された試料供給路を具備し、前記試料供給路内に前記作用極、対極および試薬層が露出し、かつ前記作用極と前記対極との距離が $150\text{ }\mu\text{m}$ 以下である。作用極と対極との距離は、 $40\sim 150\text{ }\mu\text{m}$ が好ましく、より好ましくは $40\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ である。

本発明によるバイオセンサは、前記試料供給路内に毛管作用により収容される試料液量は、 $10\text{ nl}\sim 5\text{ }\mu\text{l}$ であるのが好ましく、より好ましくは $50\text{ nl}\sim 500\text{ nl}$ である。

このようにすると、作用極と対極間の電荷移動が容易になるとともに、作用極上における酸化還元種の拡散層の広がりを抑制し、拡散層での酸化還元種の濃度勾配が高い状態で維持されることにより、センサ応答が増加する。

ここで、対極の試料供給路に露出している部分の面積 S_2 が、作用極の試料供給路に露出している部分の面積 S_1 と同じかそれ以下であり、かつ

対極が作用極の直上に位置することが好ましい。ここで、対極が作用極の直上に位置するとは、作用極の垂直方向から見て、対極の全部が作用極に重なるように形成されていることを意味する。

一般に電気化学分野の測定系では、対極における反応が律速とならないように、対極の面積を作用極の面積よりも大きくする。しかし、本発明のバイオセンサでは、対極と作用極とが対向した位置に配置されているので、対極の面積を作用極の面積と同じかそれ以下にすると、対極の面積が作用極の面積よりも大きい場合と比較して、対極上の電流密度がより高くなる等の理由により、対極近傍における酸化還元種の濃度が高くなると考えられる。センサ応答は、対極近傍における酸化還元種の濃度に依存するため、結果として、基質を高感度に定量することが可能となる。また、対極の面積の減少に伴い、試料供給路の容積を低減することができるので、サンプル量の削減が可能となる。対極の面積は、作用極の面積よりも小さいことが好ましい。このようにすると、上記の効果がより顕著になる。

作用極が第1の絶縁性基板上に形成され、対極が第2の絶縁性基板上に形成されていることが好ましい。このようにすると、バイオセンサの製造工程が容易になる。

ここで、第1の基板と第2の基板とが、スペーサ部材を挟む構造であることが好ましい。このようにすると、基板への物理的圧力に対しての強度が増加するので、作用極と対極との接触による短絡を防止することができるとともに、電流応答への物理的圧力の影響を低減することができる。

本発明の第1および第2の基板としては、電気絶縁性を有し、保存および測定時に十分な剛性を有する材料であれば用いることができる。例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、飽

和ポリエステル樹脂等の熱可塑性樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、不飽和ポリエステル樹脂等の熱硬化性樹脂があげられる。中でも、電極との密着性の点から、ポリエチレンテレフタレートが好ましい。

スペーサ部材としては、電気絶縁性を有し、保存および測定時に十分な剛性を有する材料であれば用いることができる。例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリアミド、飽和ポリエステル樹脂等の熱可塑性樹脂、尿素樹脂、メラミン樹脂、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、不飽和ポリエステル樹脂等の熱硬化性樹脂があげられる。

作用極としては、電子伝達体を酸化する際にそれ自身が酸化されない導電性材料であれば用いることができる。対極としては、パラジウム、金、白金、カーボン等の一般的に用いられる導電性材料であれば用いることができる。

酸化還元酵素としては、試料中に含まれる測定対象の基質に対応したものが用いられる。例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ等があげられる。

本発明のバイオセンサは、試薬層に電子伝達体を含むことが好ましい。電子伝達体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体等があげられる。また、酸素を電子伝達体とした場合にも電流応答が得られる。電子伝達体は、これらの一種または二種以上が使用される。

本発明のバイオセンサは、試薬層に親水性高分子を含むことが好ましい。親水性高分子としては、種々のものを用いることができる。例えば、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチル

セルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジン等のポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、ポリアクリル酸およびその塩、ポリメタアクリル酸およびその塩、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸またはその塩の重合体があげられる。中でも、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、およびヒドロキシプロピルセルロースが好ましい。

以下、本発明の実施の形態を図面を参照して詳しく説明する。構造を表す図面においては、各要素の相対的な位置やサイズは必ずしも正確ではない。

実施の形態 1

バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。

図 1 および図 2 を用いて、本実施の形態を説明する。図 1 は本実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた分解斜視図であり、図 2 はその縦断面図である。

11 はポリエチレンテレフタレートからなる第 1 の電気絶縁性の基板を表す。この基板 11 上には、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、作用極リード 12 および電極の下地が形成され、ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを電極の下地上に印刷して作用極 14 が形成されている。この作用極 14 は、作用極リード 12 と接触している。基板 11 上には、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層 16 が形成されている。絶縁層 16 は、作用極 14 の外周部を覆っており、これにより作用極 14 の露出部分の面積を一定に保っている。

次に、第 2 の電気絶縁性の基板 21 の裏面に、銀ペーストを印刷して

対極リード 23 および電極の下地を形成し、次いで導電性カーボンペーストを前記電極の下地上に印刷して対極 25 を形成し、さらに対極 25 の露出部分の面積が作用極 14 の露出部分の面積よりも大きくなるように、絶縁性ペーストを印刷して、絶縁層 27 が形成されている。基板 21 には、空気孔 29 が形成されている。

酵素である GOD および電子伝達体のフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を基板 11 の作用極 14 上に滴下した後、乾燥して試薬層 10 が形成される。さらに、試薬層 10 上に、界面活性剤であるレシチンを含む界面活性剤層 20 が形成されている。

最後に、基板 11、基板 21、およびスペーサ部材 17 を、図 1 中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、図 2 のようなグルコースセンサが組み立てられる。

基板 11 と基板 21 との間に挟み込むスペーサ部材 17 は、スリット 18 を有しており、このスリット 18 は基板 11 と 21 との間に、試料供給路となる空間部を形成する。このスペーサ部材 17 の厚みを、変化させることにより、試料供給路の高さ、すなわち作用極 14 と対極 25 との距離を変えることができる。

基板 21 の空気孔 29 は、前記の試料供給路に連通しているので、スリット 18 の解放端に形成される試料供給口 19 に試料を接触させれば、毛管現象により試料は容易に試料供給路内にある試薬層 10 に達する。

実施の形態 2

図 3 は、本実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた斜視図である。本実施の形態では、対極 25a を作用極 14 と同様に四角形とし、その面積を作用極のそれと等しくした。その他は、実施の形態 1 と同様である。

実施の形態 3

図 4 は、本実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた斜視図であり、図 5 はその縦断面図である。

このグルコースセンサは、以下のような手順で作製される。

まず、両側に立ち上がり片 37、37 を有する電気絶縁性の基板 31 上に、パラジウムをスパッタリングして、作用極 34 およびそのリード 32 を形成する。次に、基板 31 上に絶縁性部材 36 を貼付することにより、作用極 34 および測定器に挿入するリード 32 の端子部を規定する。一方、第 2 の電気絶縁性基板 41 の内面に、同じくパラジウムをスパッタリングして対極 45、および対極リード 43 を作製する。次に、基板 41 の内面に絶縁性部材 47 を貼付することにより、対極 45 および測定器に挿入するリード 43 の端子部を規定する。

次いで、基板 31 に第 2 の基板を接合する。この時、作用極 34 と対極 45 は、基板 31 と基板 41 との間に形成される空間部を介して対向する位置に配置される。作用極と対極間の距離は、例えば $100\ \mu\text{m}$ とする。試薬層 30 および界面活性剤層 40 は、実施の形態 1 と同様にし、電極 34 を覆うように形成される。このようにして作製されるセンサは、電極 34 および 45 に近い方の端面が試料供給口 39 となる。ここから供給される試料は、空気孔 49 に連なる空間部の毛管作用により電極部に達する。

実施の形態 4

図 6 は本実施の形態におけるグルコースセンサの試薬層および界面活性剤層を除いた斜視図であり、図 7 はその縦断面図である。

このグルコースセンサは、以下の手順で作製される。

電気絶縁性の第1の基板51上に、パラジウムをスパッタリングして、作用極54およびそのリード52を形成する。次に、基板51上に、絶縁性部材56を貼付することにより、作用極54、および測定器に挿入するリード52の端子部を規定する。一方、外側に膨出した曲面部68を有する第2の電気絶縁性基板61の曲面部68の内壁面に、パラジウムをスパッタリングして対極65およびそのリード63を形成する。曲面部68の曲率を調節することにより、作用極54と対極65との距離を制御することができる。

次に、基板61の内壁面に、絶縁性部材67を貼付することにより、対極65、および測定器に挿入する端子部を規定する。この時、対極65の面積が作用極54の面積と等しくなるようにする。対極65の端子部は、基板61の後端61aの裏面に露出している。曲面部68の端部には、空気孔69を有する。作用極54上に試薬層50を形成し、さらにこれを覆うように界面活性剤層60を形成する。最後に、基板51と基板61を貼り合わせて、グルコースセンサを組み立てる。

実施例1

実施の形態1において、スペーサ部材17の厚みを変えることにより、試料供給路の高さの異なる5種のセンサを作製した。作用極の面積は 1.0 mm^2 である。対極は、直径約 3.6 mm の円形であるが、その直径がスペーサ部材17のスリット18の幅より大きいので、一部は試料供給路に露出しない。対極の試料供給路に露出する部分の面積は約 5.3 mm^2 である。

比較例として、同一基板上に作用極と対極を有するグルコースセンサを作製した。実施例1と同様に、試料供給路の高さの異なる5種のグルコースセンサを作製した。図8は比較例のセンサの試薬層および界面活

性剤層を除いた分解斜視図であり、図9はその縦断面図である。

ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性基板101上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、作用極リード102および対極リード103を形成し、次いで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを印刷して作用極104を形成した。この作用極104は、作用極リード102と接触している。さらに、この基板101上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層106を形成した。絶縁層106は、作用極104の外周部を覆っており、これにより作用極104の露出部分の面積を一定に保っている。次に、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを、対極リード103と接触するように基板101上に印刷して対極105を形成した。作用極104の面積は 1.0 mm^2 、対極105の試料供給路に露出する部分の面積は約 4.3 mm^2 である。

酵素のGODおよび電子伝達体のフェリシアン化カリウムを含有する水溶液を作用極104および対極105上に滴下した後乾燥して試薬層107を形成し、その試薬層107上に、界面活性剤であるレシチンを含有する界面活性剤層109を形成した。これらの基板101、空気孔114を備えたカバー112、およびスリット111を有するスペーサ部材110を図8中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着した。

以上の実施例1および比較例のセンサを用いて、一定量のグルコースを含む水溶液のグルコース濃度の測定を行った。試料を試料供給口から試料供給路に供給し、一定時間経過後に、対極を基準にして作用極に 500 mV の電圧を印加した。この電圧印加により、作用極と対極との間に流れる電流値を測定したところ、試料中のグルコース濃度に比例した電流応答が観察された。

グルコースを 180 mg/dl 含む溶液について、試料供給路の高さ

が異なる各グルコースセンサにより応答電流値を測定した。図10は、実施例1のセンサによる試料供給路の高さと応答値（比）との関係を示したものである。応答値（比）は、試料供給路の高さの等しい比較例のセンサによる応答値を100とした比で示している。

図10からわかるように、試料供給路の高さを150 μm 以下にすると、実施例1の比較例に対する応答値（比）が急激に増加している。これは、作用極と対極が相互に対向し、作用極－対極間の距離が150 μm 以下であると、作用極での酸化還元種の拡散層の成長が抑制され、対極上の酸化還元種の濃度がセンサ応答に反映すること、および作用極－対極間の電荷移動等が良好となることによるものであると考えられる。

また、実施例1においては、測定に必要なサンプル量が約0.5～3.0 μl であった。このように本発明によると、作用極－対極間の距離が限定されるため、測定に必要なサンプル量を削減することが可能となった。

実施例2

実施の形態2において、作用極および対極の面積をいずれも1.0 mm^2 とした他は、実施例1と同様の方法にてバイオセンサを作製した。そして、グルコースを90 mg/dl 含む溶液について、試料供給路の高さが異なる各グルコースセンサにより応答電流値を測定した。図11は、実施例2のセンサによる試料供給路の高さ、すなわち作用極－対極間距離と応答値（比）との関係を示したものである。応答値（比）は、試料供給路の高さの等しい実施例1のセンサによる応答値を100とした比で示している。

図11からわかるように、試料供給路の高さを150 μm 以下にすると、実施例2のセンサの実施例1に対する応答値（比）が急激に増加し

ている。これは、作用極と対極が相互に対向し、作用極－対極間の距離が $150\mu\text{m}$ 以下であると、作用極での酸化還元種の拡散層の成長が抑制され、対極上の酸化還元種の濃度がセンサ応答に反映すること、および作用極－対極間の電荷移動等が良好となることによるものであると考えられる。

一般の電気化学においては、対極における反応が律速になることを防ぐために、対極の面積は作用極の面積よりも大きくする。しかし、この系では、作用極と対極を対向に配置するため、対極上の電流密度が電流応答に反映される等の理由により、対極の面積が作用極の面積より大きい場合に比べて、高い応答電流が得られたと考えられる。

本実施例では、対極の面積が作用極と同等であるために、実施例1よりも空気孔29の位置を試料供給口側に近づけている。したがって、測定に必要なサンプル量をさらに削減することが可能となる。

実施例3

本実施例では、対極面積を 0.64mm^2 とした他は、実施例2と同様にしてバイオセンサを作製した。そして、グルコースを 90mg/dl 含む溶液について、試料供給路の高さが異なる各グルコースセンサにより応答電流値を測定した。図12は、実施例3のセンサによる試料供給路の高さ（作用極－対極間距離）と応答値（比）との関係を示したものである。応答値（比）は、試料供給路の高さの等しい実施例1のセンサによる応答値を100とした比で示している。

図12からわかるように、作用極－対極間距離を $150\mu\text{m}$ 以下にすると、本実施例の実施例1に対する応答値（比）が急激に増加している。これは、実施例2で説明したものと同様の理由によるものと考えられる。

本実施例では、対極の面積が作用極よりも小さいために、実施例2よ

りも空気孔の位置を試料供給口側に近づけることができる。したがって、測定に必要なサンプル量を実施例 2 よりもさらに削減することが可能となる。

産業上の利用の可能性

以上のように本発明によれば、測定に必要なサンプル量が少なく、かつ高感度のバイオセンサを得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. 作用極を有する第1の絶縁性基板、前記作用極と対向させた対極を有する第2の絶縁性基板、少なくとも酸化還元酵素を含む試薬層、並びに第1および第2の絶縁性基板の間に形成された試料供給路を具備し、前記試料供給路内に前記作用極、対極および試薬層が露出し、かつ前記作用極と前記対極との距離が $150\mu\text{m}$ 以下であることを特徴とするバイオセンサ。

2. 前記対極の試料供給路に露出している部分の面積が、前記作用極の試料供給路に露出している部分の面積と同じかそれ以下である請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

3. 前記作用極の試料供給路に露出している部分の面積が $0.1\sim$

2.0mm^2 であり、前記対極の試料供給路に露出している部分の面積が $0.05\sim 2.0\text{mm}^2$ である請求の範囲第2項記載のバイオセンサ。

4. 前記作用極と前記対極との距離が $40\mu\text{m}$ 以上である請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

5. 第1および第2の絶縁性基板の間に、スリットを有するスペーサ部材が挿入され、前記スリットの部分に前記試料供給路が形成された請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

FIG. 1

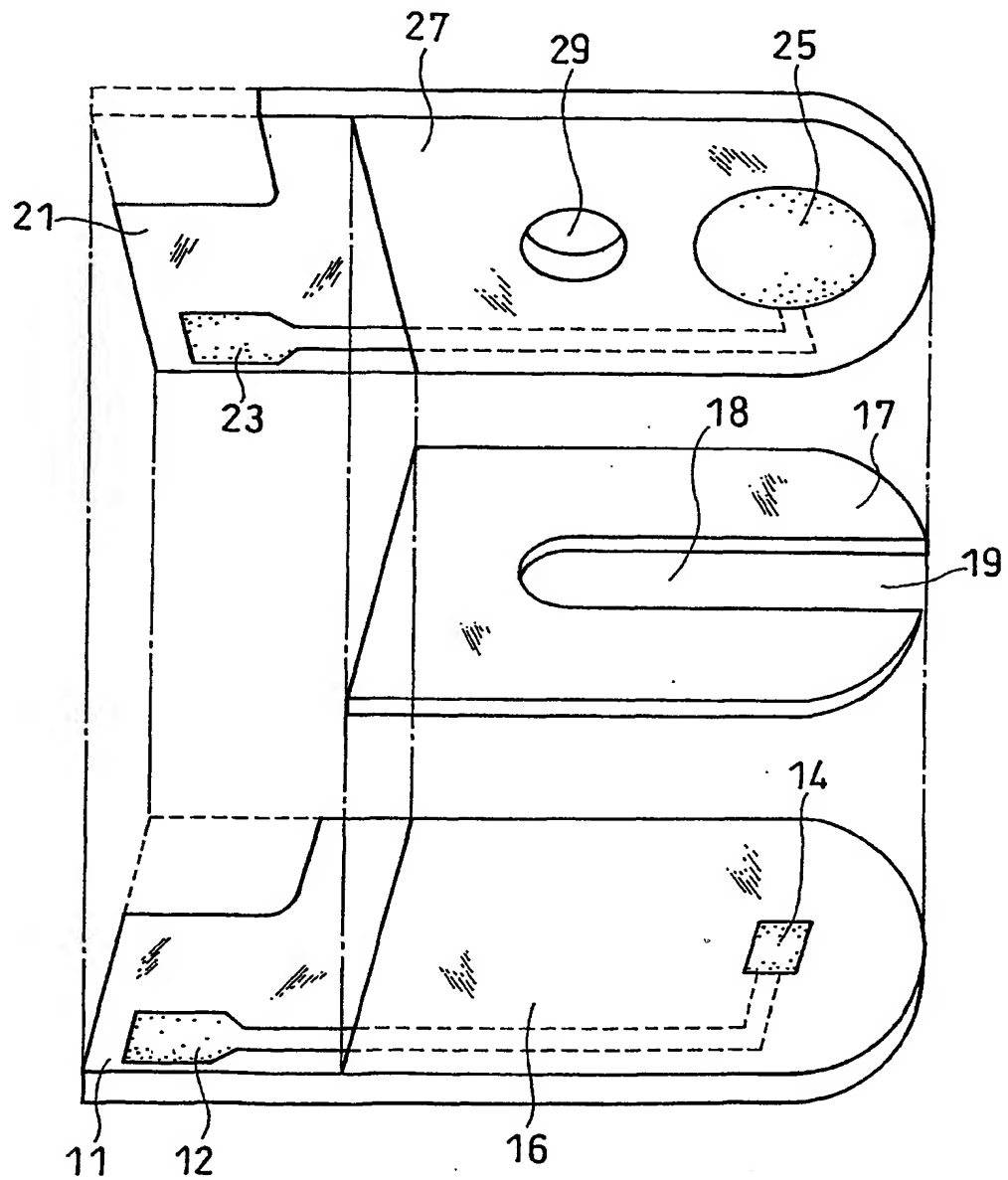


FIG. 2

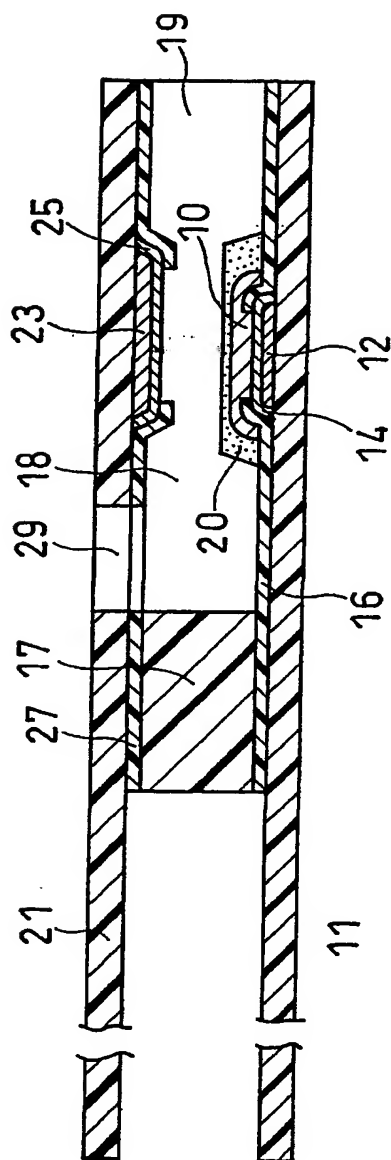


FIG. 3

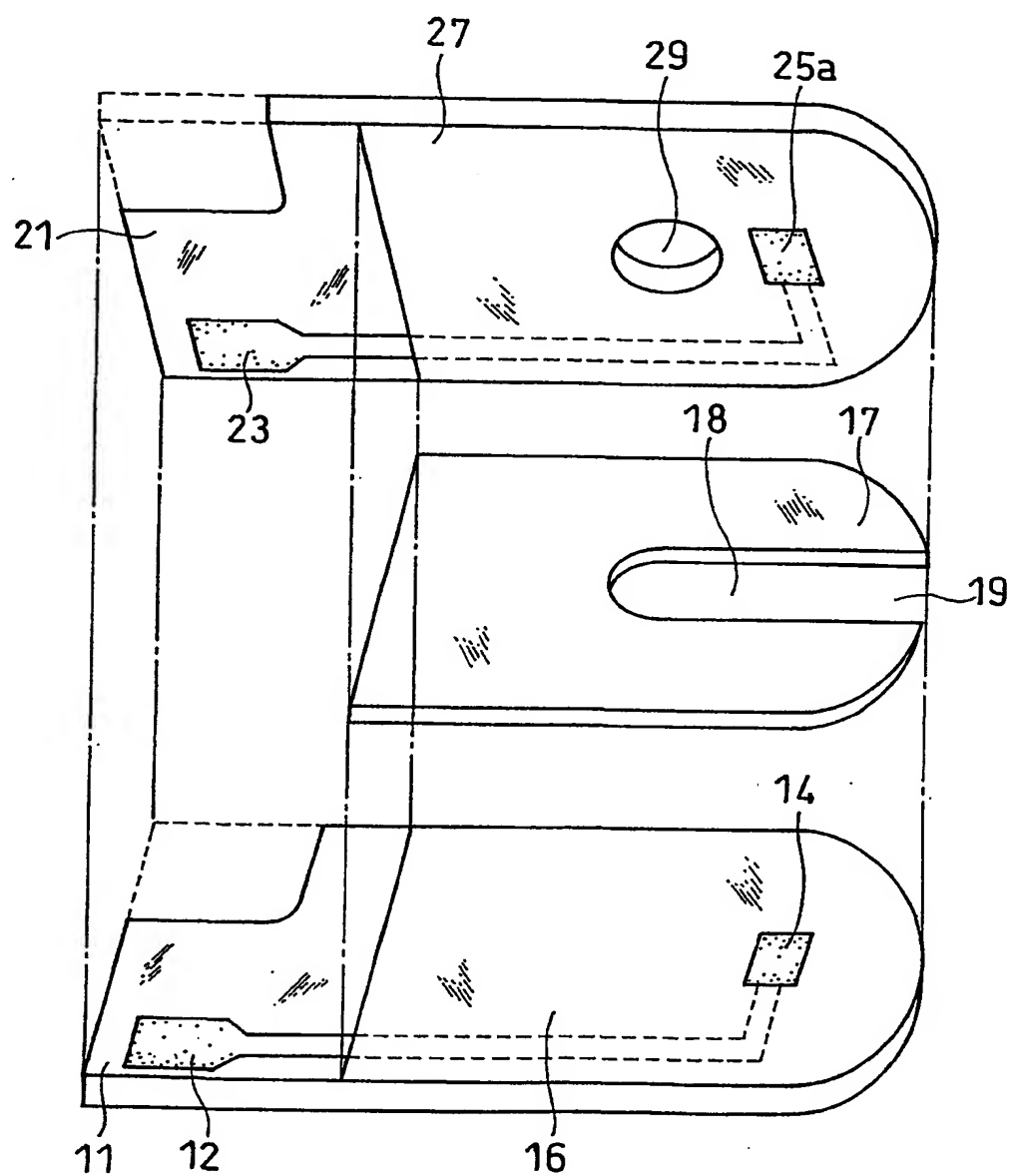


FIG. 4

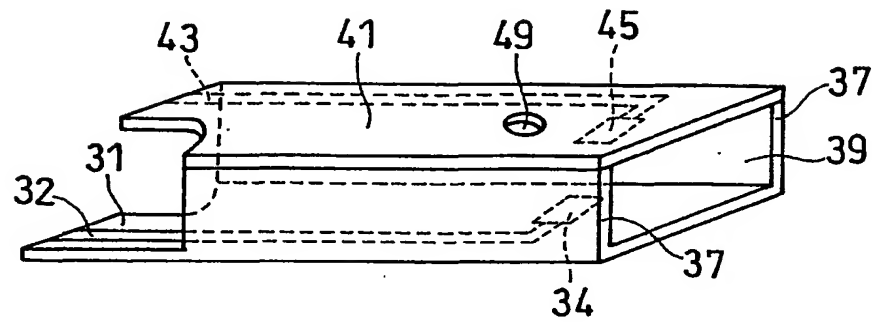


FIG. 5

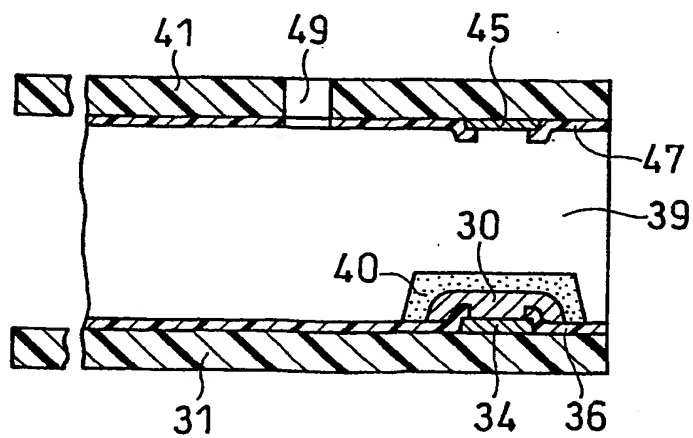


FIG. 6

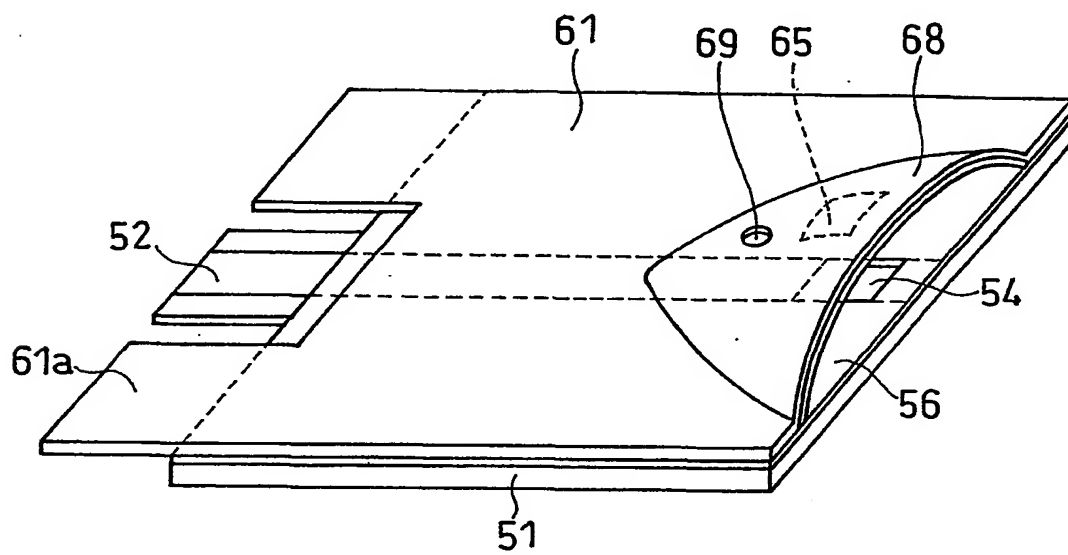


FIG. 7

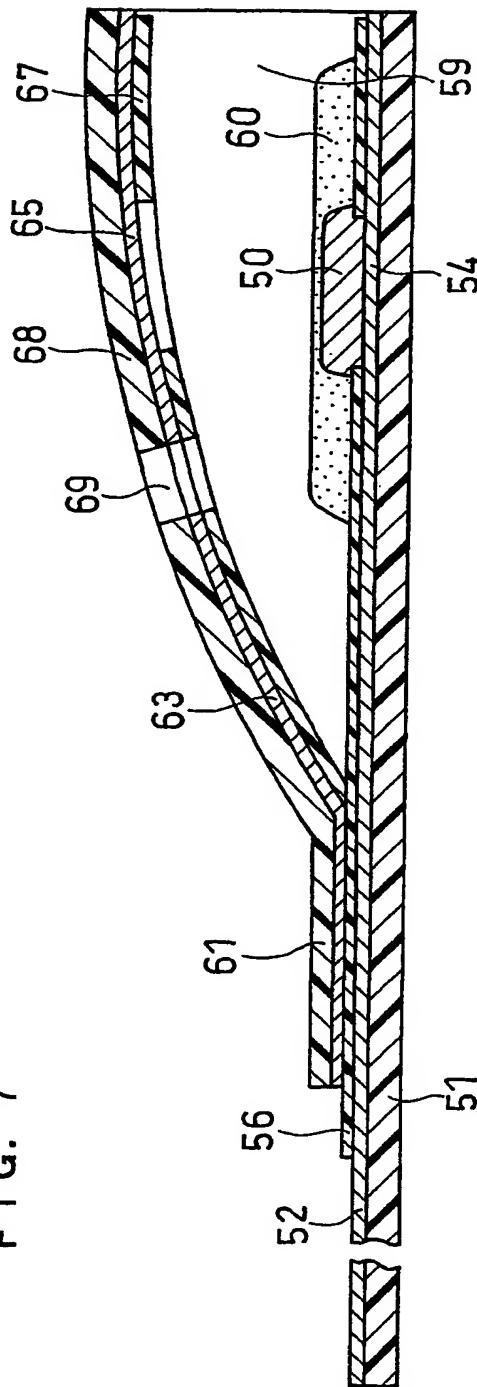


FIG. 8

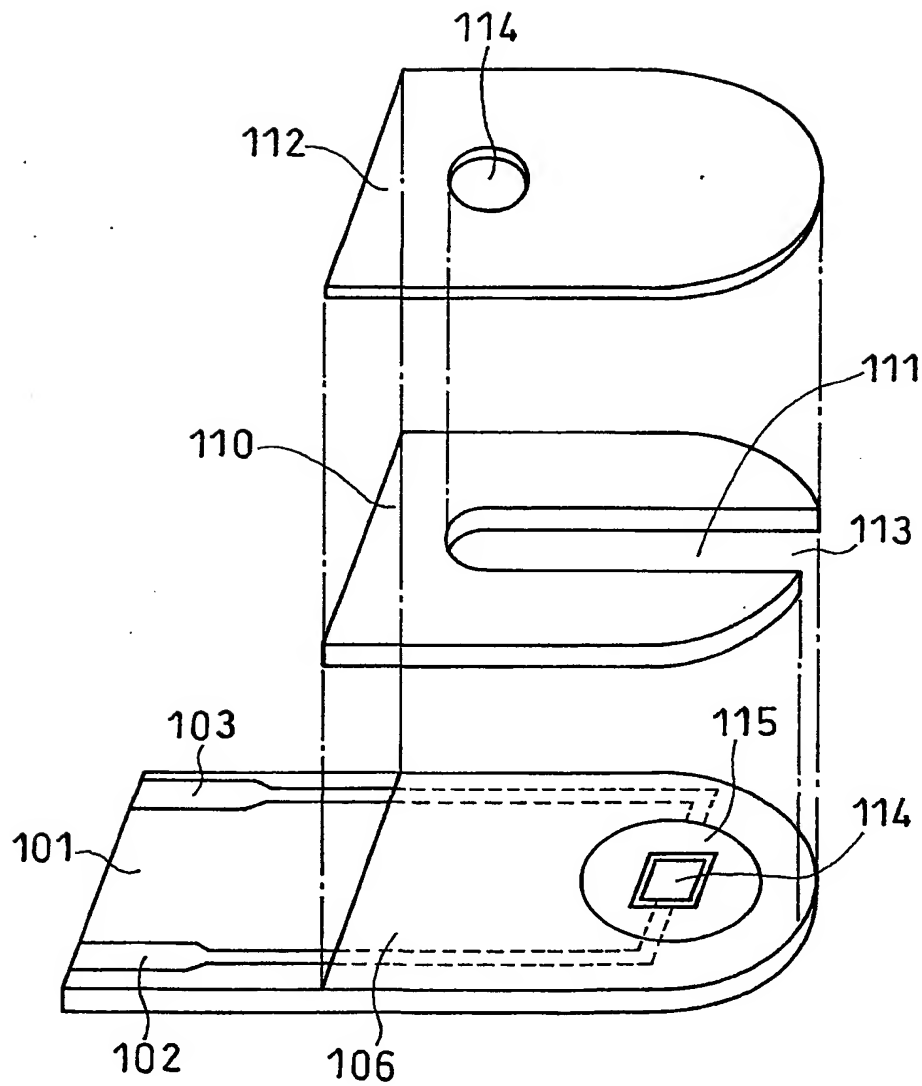


FIG. 9

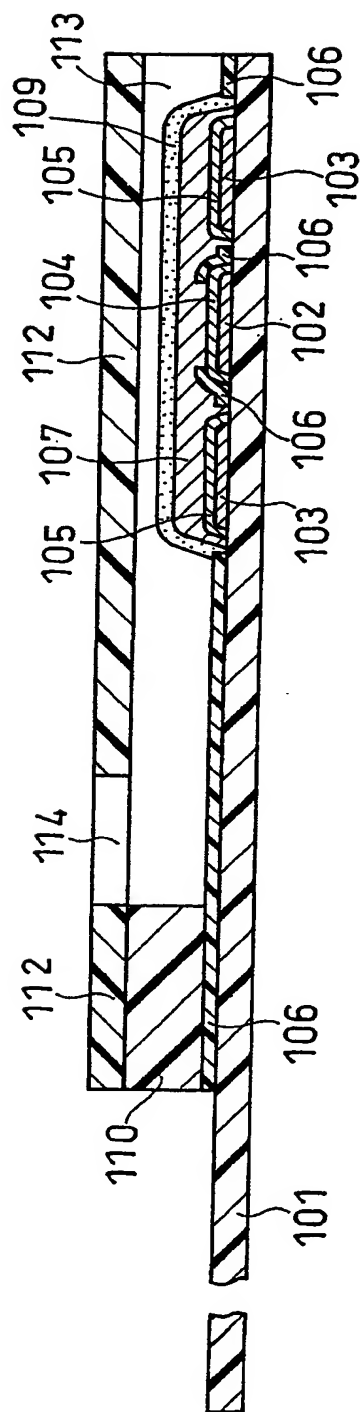


FIG. 10

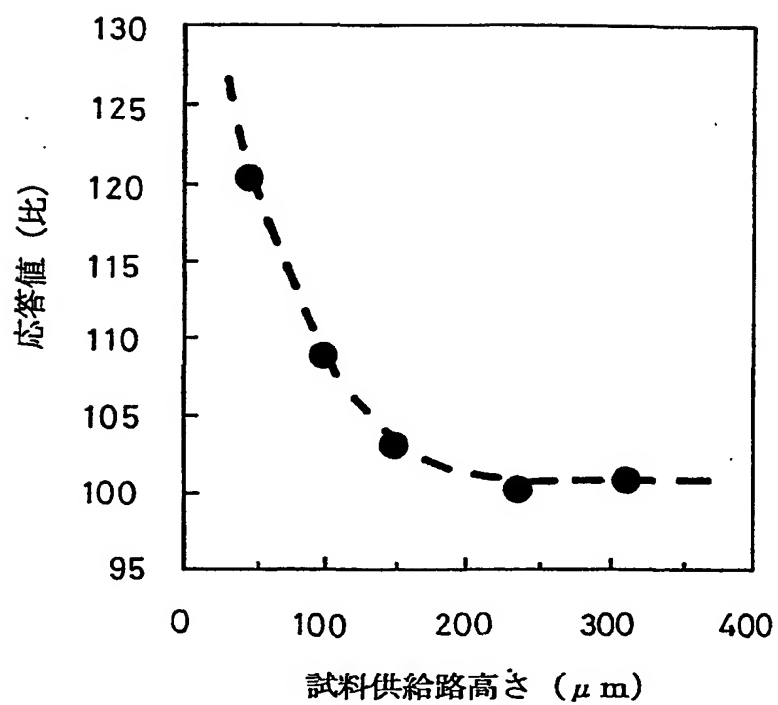
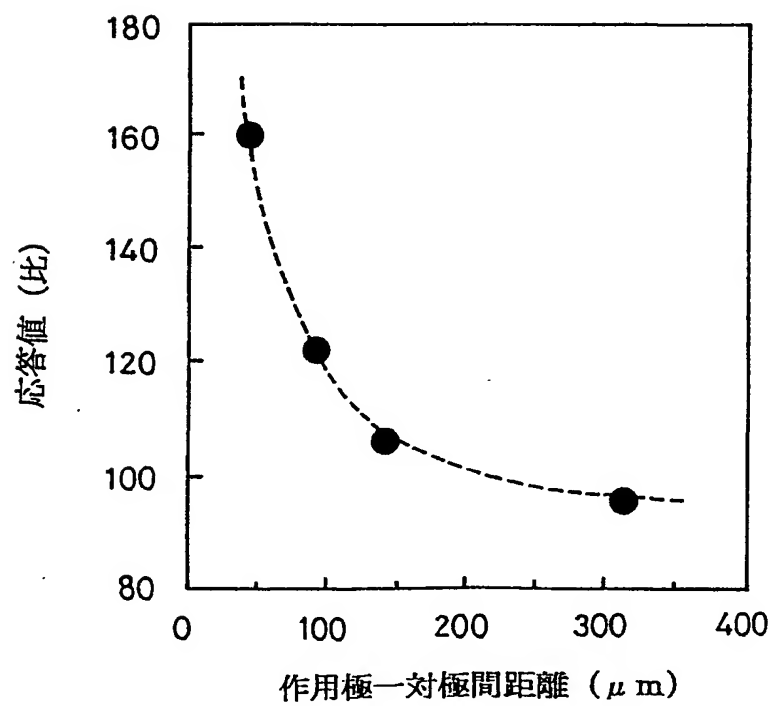
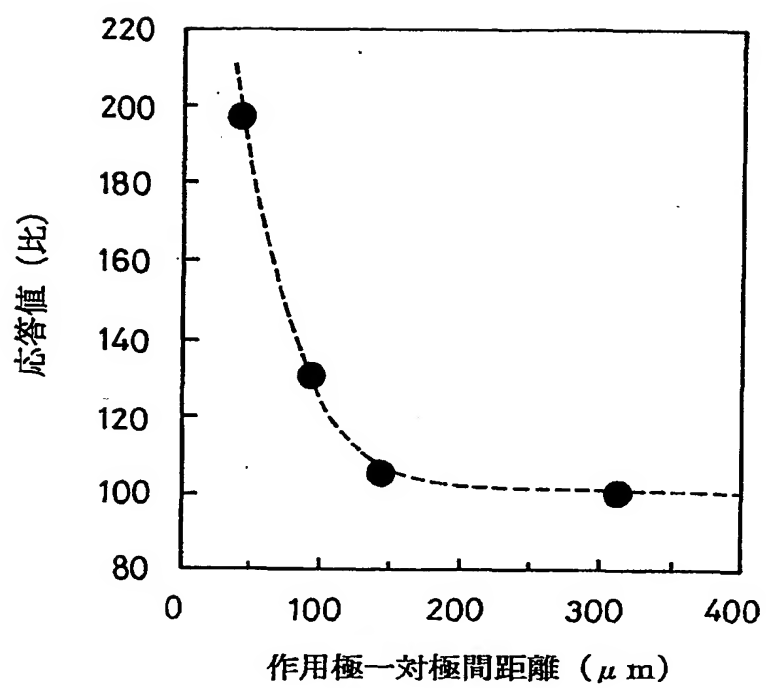


FIG. 11



10/10

FIG. 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N27/447

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2001
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2001	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 9-159642 A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 20 June, 1997 (20.06.97), Par. Nos. [0006], [0017]; Fig. 3 Par. Nos. [0006], [0017], [0010]; Fig. 3 (Family: none)	1, 2, 4 3, 5
X Y	JP 10-2874 A (NOK Corporation), 06 January, 1998 (06.01.98), Par. Nos. [0005], [0006]; Fig. 3 Par. Nos. [0005], [0006]; Fig. 3 (Family: none)	1, 4 5
X Y	JP 2000-65777 A (NOK Corporation), 03 March, 2000 (03.03.00), Par. Nos. [0009], [0013]; Fig. 2 Par. Nos. [0009], [0013]; Fig. 2 (Family: none)	1, 4 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 August, 2001 (01.08.01)Date of mailing of the international search report
14 August, 2001 (14.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/06188

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 685737 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 12 June, 1995 (12.06.95), page 4, line 8 & US 5575895 A & CA 2150791 A & JP 8-50113 A	3
Y	EP 964059 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 15 December, 1999 (15.12.99), Figs. 2 to 5 & JP 2000-81409 A	5
A	EP 969282 A2 (NEC Corporation), 05 January, 2000 (05.01.00), Par. No. [0220] & CN 1243951 A & JP 11-352093 A	2
P,X	JP 2000-258382 A (Arkray Co., Ltd.), 22 September, 2000 (22.09.00), Par. Nos. [0011], [0023]; Figs. 1, 3 (Family: none)	1,2,4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/447

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/447

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 9-159642 A (大日本印刷株式会社) 20. 6月. 1997 (20. 06. 97) 段落番号【0006】、【0017】第3図 段落番号【0006】、【0017】、【0010】、第3図 (ファミリーなし)	1, 2, 4 3, 5
X Y	JP 10-2874 A (NOK株式会社) 6. 1月. 1998 (06. 01. 98) 段落番号【0005】、【0006】、第3図 段落番号【0005】、【0006】、第3図 (ファミリーなし)	1, 4 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 01. 08. 01

国際調査報告の発送日 14.08.01

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
黒田 浩一



2J 3010

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 2000-65777 A (NOK株式会社) 3. 3月. 2000 (03. 03. 00) 段落番号【0009】、【0013】、第2図 段落番号【0009】、【0013】、第2図 (ファミリーなし)	1, 4 5
Y	EP 685737 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 12. 6月. 1995 (12. 06. 95) 第4頁第8行 & US 5575895 A & CA 2150791 A & JP 8-50113 A	3
Y	EP 964059 A2 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 15. 12月. 1999 (15. 12. 99) 第2図-第5図 & JP 2000-81409 A	5
A	EP 969282 A2 (NEC CORPORATION) 5. 1月. 2000 (05. 01. 00) 段落番号【0220】 & CN 1243951 A & JP 11-352093 A	2
P, X	JP 2000-258382 A (アークレイ株式会社) 22. 9月. 2000 (22. 09. 00) 段落番号【0011】、【0023】、第1, 3図 (ファミリーなし)	1, 2, 4